

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6234475号  
(P6234475)

(45) 発行日 平成29年11月22日(2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/352

A61K 47/61 (2017.01)

A61K 47/61

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/00

請求項の数 18 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2015-546927 (P2015-546927)  
 (86) (22) 出願日 平成25年11月28日 (2013.11.28)  
 (65) 公表番号 特表2016-502984 (P2016-502984A)  
 (43) 公表日 平成28年2月1日 (2016.2.1)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2013/074957  
 (87) 國際公開番号 WO2014/090583  
 (87) 國際公開日 平成26年6月19日 (2014.6.19)  
 審査請求日 平成28年9月15日 (2016.9.15)  
 (31) 優先権主張番号 102012222777.6  
 (32) 優先日 平成24年12月11日 (2012.12.11)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)  
 (31) 優先権主張番号 13150909.3  
 (32) 優先日 平成25年1月11日 (2013.1.11)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者 512185235  
 ザピオテック・ゲゼルシャフト・ミット・  
 ベシュレンクテル・ハフツング  
 S A P I O T E C G m b H  
 ドイツ97082ヴュルツブルク、ニコラ  
 ウスシュトラーセ18番  
 (74) 代理人 100101454  
 弁理士 山田 卓二  
 (74) 代理人 100062144  
 弁理士 青山 葵  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子  
 (74) 代理人 100156144  
 弁理士 落合 康

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】メラノーマ細胞に対抗するためのデルフィニジン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル- - -シクロデキストリンの複合体を含む、悪性黒色腫の処置のための組成物。

## 【請求項2】

複合体におけるスルホアルキルエーテル- - -シクロデキストリンがスルホブチルエーテル- - -シクロデキストリンであることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

複合体におけるシクロデキストリンのスルホアルキルエーテル基での置換度が、3から8であることを特徴とする、請求項1または2に記載の組成物。

10

## 【請求項4】

複合体におけるシクロデキストリンのスルホアルキルエーテル基での置換度が、4から8であることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に組成物。

## 【請求項5】

複合体におけるシクロデキストリンのスルホアルキルエーテル基での置換度が、5から8であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に組成物。

## 【請求項6】

複合体におけるシクロデキストリンのスルホアルキルエーテル基での置換度が、6から7であることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に組成物。

## 【請求項7】

20

組成物が、デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル - - シクロデキストリンの複合体の治療的有効量を含むことを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

組成物が单一製剤として用いられることを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

組成物が少なくとも 1 個のさらなる治療的活性物質を含むことを特徴とする、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

10

治療的活性物質が、

- 細胞増殖抑制剤、
- インターフェロン、および
- 腫瘍ワクチン

からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

インターフェロンが、 - および / または - インターフェロンである、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 12】

20

- インターフェロンが、インターフェロン - 2 a および / または - 2 b である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

1 個またはそれ以上の薬学的な助剤および / または添加剤をさらに含む、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

1 個またはそれ以上の薬学的な助剤および / または添加剤が、薬学的に許容される担体、充填剤、香料および安定化剤からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 15】

30

投与のための製剤形態が、経口形態、経直腸形態、ならびに腹腔内、経皮、皮下、筋肉内、静脈内、点眼、経肺および経鼻を含む非経腸形態からなる群より選択される形態である、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

投与形態が、錠剤、カプセル剤、懸濁剤、エアロゾル剤、液剤、クリーム剤、ペースト剤、ローション剤、ゲル剤および軟膏剤からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 17】

デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル - - シクロデキストリンの複合体が、デルフィニジンの制御放出および / または遅延放出のためのガレヌス製剤に使用されることを特徴とする、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

40

- メラノーマ細胞または悪性黒色腫罹患組織の外科的除去、
- 放射線療法、
- 免疫療法、
- 化学療法、および
- インターフェロン処置

からなる群より選択される処置を受けたか、該処置を受けているか、または該処置を受ける準備をしている対象における悪性黒色腫の処置のための、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

**【0001】**

本発明は、悪性黒色腫の処置における使用のための、デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル - シクロデキストリンの複合体および / またはデルフィニジンまたはその塩を含む組成物に関する。

**【背景技術】****【0002】**

“ 黒色調の皮膚癌 ” としても知られる悪性黒色腫は、色素細胞、いわゆるメラノサイトの悪性変性である。癌は、早期であっても循環系およびリンパ系を通して転移を拡大する傾向がある。悪性黒色腫は、少なくとも、早期に診断され、治療されれば、治療可能である。

10

**【0003】**

最も重要な処置法は、放射線療法に加えて腫瘍の外科的除去であるが、インターフェロンでの単剤療法もまた、悪性黒色腫の処置に用いられる。ワクチン療法もまた公知であり、すなわち、癌細胞を特異的に排除するための身体の抵抗力を高めるために、腫瘍ワクチンを用いて腫瘍接種することによる能動免疫療法が知られている。この場合において、腫瘍の特徴（例えば、腫瘍細胞または腫瘍細胞の細胞断片により生産されるタンパク質分子）は、免疫細胞がこれらの特徴を異物として認識し、これらの特徴を有する自身の細胞を攻撃するように、投与されるワクチンによって免疫細胞に提示される。ワクチン療法に加えて、化学療法、すなわち、腫瘍細胞を損傷し、または阻止する（細胞増殖抑制）化学物質による治療は、実際に適用されている。

20

**【発明の概要】****【0004】**

本発明の目的は、従来技術から公知の悪性黒色腫のための治療の選択肢の代替または補足として効果的な治療を提供することにある。

**【0005】**

この目的は、独立請求項に記載の組成物および使用によって達成され、一方、本発明の有利な態様は従属請求項に開示されている。この目的が実際に達成されることは、メラノーマ細胞と非癌性の細胞における本発明の組成物の効果、および実施例 6 から 12 に記載の細胞生存率における本発明の組成物の効果のインピトロでの実験結果によって証明されている。

30

**【0006】**

初めに、本明細書の文脈において使用される用語を説明する。

**【0007】**

本発明の組成物は、悪性黒色腫を有する対象または個体を処置するために使用される。用語 “ 対象 ” は、生存動物およびヒトを含む。この処置の目的は、少なくとも部分的な腫瘍細胞の細胞死または中和である。“ 中和 ” または “ 細胞死 ” は、本明細書の文脈中、少なくとも部分的な腫瘍細胞の破壊または分解または増殖の不活化を意味する。

**【0008】**

本発明はまた、悪性黒色腫の対象を処置するための方法であって、本発明の組成物の治療的有効量を対象に投与することを意味する。特に興味深いのは、非癌性細胞の生存性および増殖に可能な限り影響を与えることなく、活性成分を用いてメラノーマ細胞を排除することである。

40

**【0009】**

用語 “ 処置 ” は、本明細書の文脈において、以下の特定の結果の完全または部分的な達成を意味する：臨床像の完全または部分的な軽減；疾患に関連する臨床的症状または指標の少なくとも 1 つの改善；疾患の進行の遅延、抑制または疾患進行からの保護の提供；または、疾患の発症または進行の完全または部分的な遅延、抑制またはそれからの保護。治療される対象は、ヒトまたは動物、好ましくは哺乳動物である。獣医学的処置は、家畜または野生動物（例えば、ヒツジ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ）の処置の他に、実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、サル）の処置も含む。

50

## 【0010】

用語“デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル - シクロデキストリンの複合体、および / またはデルフィニジンまたはその塩を含む組成物”は、単剤療法剤としての組成物、すなわち、さらなる治療的活性成分を含まない組成物を含む。あるいは、組成物は、少なくとも 1 種のさらなる治療的活性物質を含んでいてよい。本発明の組成物は、悪性黒色腫の 1 またはそれ以上の症状を軽減するために、単独で、または少なくとも 1 種の他の治療剤と組み合わせて投与され得る。本発明の組成物は、同じ組成物の 1 成分であり得るか、または別の組成物中に提供される他の治療剤と同時に投与され得る。あるいは、本発明の組成物は、他の治療剤の投与前または投与後に投与され得る。本発明の組成物は、他の治療剤と同じ投与経路で、または異なる投与経路で投与され得る。

10

## 【0011】

さらなる治療的活性物質は、好ましくは腫瘍壞死因子関連アポトーシス誘導リガンド (T R A I L) である。本発明のさらに好ましい態様により、さらなる治療的活性物質は、細胞増殖抑制、インターフェロン、好ましくはアルファ - および / またはベータ - インターフェロン、より好ましくはインターフェロン アルファ - 2 a およびアルファ - 2 b、および腫瘍ワクチンからなる群より選択される。後者はまた、T R A I L と併用および組み合わせて使用され得る。

## 【0012】

特に、転移が既に他の臓器内に形成されているとき、個々の転移の化学療法、免疫療法、および放射線治療の組み合わせは、緩解を達成するために適当であり得る。

20

## 【0013】

インターフェロン、特に白血球細胞（白血球）中に形成される I F N - および結合組織細胞（線維芽細胞）中に形成される I F N - は、典型的に、化学療法において使用され、それは健常細胞ならびに悪性細胞の増殖を阻止し、免疫系を刺激する。癌治療は、通常、遺伝子工学によって得られた純粋なインターフェロン、例えば、ドイツで癌治療のために承認されたインターフェロン アルファ - 2 a (R o f e r o n (登録商標)) およびインターフェロン アルファ - 2 b (I n t r o n A (登録商標)) に頼っている。

## 【0014】

ほとんど使用されなくなってきた免疫療法では、自身の腫瘍細胞を放射線照射により分割不可能にし、免疫系の刺激を増加させる目的で、免疫細胞を誘引し、当該腫瘍細胞に対して選択的に標的化するために、皮膚に、好ましくはウイルスと混合して注射するという従前の考え方がある。全腫瘍細胞または細胞断片を用いる代わりに、インビトロで造血前駆細胞から培養された細胞に、腫瘍細胞が生産したタンパク質分子を加える方法が利用されており、そのようにして調整された培養物を患者に戻して、それらを免疫細胞が攻撃すべきものとして提示することが実施されている。あるいは、同様の結果が、免疫細胞に対する誘引物質または活性化物質のための遺伝子が腫瘍細胞中に挿入されたとき達成される。

30

## 【0015】

実用的に関連する方法はまた、異なる態様で腫瘍増殖を阻害する種々の薬物を用いた癌細胞に対する上記の化学療法であり、これらの化学療法剤は、通常、“細胞増殖抑制剤”である。細胞増殖抑制剤は、合成されるか、または腫瘍細胞のプログラムされた細胞死（アポトーシス）を誘発する天然に存在する細胞毒素から誘導される。本発明の文脈において使用され得る化学療法剤の例には、ボルテゾミブ（ベルケイド（登録商標）、Millennium）、メルファラン、プレドニゾン、ピンクリスチン、カルムスチン、シクロホスファミド、デキサメサゾン、サリドマイド、ドキソルビシン、シスプラチニン、エトポシドおよびシタラビンが含まれる。

40

## 【0016】

本発明の薬物投与に加えて、放射線療法を併用することが可能である。放射性薬物、いわゆる“放射性医薬品”的使用とは別に、放射線療法は、好ましくは、限定的方法で局在的に使用されている。このことは、好ましくは、電磁放射ならびに粒子ビームが、この場

50

合、照射領域に限定されて局所的に作用し、腫瘍細胞を損傷する、特にイオン化し、フリーラジカルを形成し、そして腫瘍細胞のDNAを切断することにより、細胞核中のDNAを損傷することを意味する。腫瘍の周囲の健常な組織を保護するために、スクリーンを使用することができる。

#### 【0017】

本発明の活性成分の単剤療法またはTRAILもしくは他のもしくはさらなる治療的活性成分、例えば細胞増殖抑制、インターフェロンおよび腫瘍ワクチンからなる群より選択される物質との併用療法はまた、いわゆる局所的療法として、例えば身体の領域、体腔内または腫瘍領域もしくは腫瘍がその中に位置する臓器の血管中への標的化注射により（例えば、カテーテルを用いることにより）行われ得る。患部または臓器の浸透はまた、医薬が患部（例えば、腕または脚）または臓器を通して流れ、残りの循環の完了時に別の場所に達することなく、再び患部を直接通過する、局所かん流によつても可能である。10

#### 【0018】

本発明の組成物は、好ましくは、医薬組成物として提供され、投与される。用語“医薬組成物”は、1またはそれ以上の活性成分および活性成分（複数可）のための担体として作用する1またはそれ以上の不活性成分を含む。医薬組成物は、本発明の複合体または本発明の組成物を、経口投与、経直腸投与、腹腔内、経皮、皮下、筋肉内、静脈内、点眼、経肺または経鼻経路を含む非経腸投与で投与するのを可能にする。非経腸投与形態は、例えば、錠剤、カプセル剤、溶液、懸濁液または分散液であつてよい。点眼、経肺または経鼻投与形態は、例えば、エアロゾル、溶液、クリーム剤、ペースト、ローション剤、ジェル、軟膏、懸濁液または分散液であつてよい。製剤または投与のための適当な技術は、先行技術から公知であり、例えば、“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co., Easton Pa.)を参照のこと。例えば、本発明の組成物は、薬学的に許容される担体（例えば、生理的食塩溶液）を用いて対象に静脈内投与され得る。水溶液、好ましくは生理的に許容される緩衝液（例えば、ハンク溶液、リングル溶液または生理的に緩衝生理食塩溶液）の製剤は、注射に好適である。静脈内、皮下、筋肉内および腹腔内投与を含む非経腸投与の場合、水性もしくは油性溶液または固形製剤もまた有用である。組成物中の活性成分の割合は変更でき、典型的に、用量単位の2～60重量%である。従って、活性成分の割合は、有効用量が達成されるように選択される。本発明の好ましい態様により、デルフィニジンまたはその塩および／またはデルフィニジンとスルホアルキルエーテル- - -シクロデキストリンの複合体は、デルフィニジンの制御放出および／または遅延放出のためのガレヌス製剤に使用される。20

#### 【0019】

“塩”または“薬学的に許容される塩”は、医薬的観点から許容される本発明の化合物の任意の塩であり、投与後に薬学的に有効な活性成分またはその活性代謝物を放出し得る。本発明の組成物および複合体の塩は、無機酸または有機酸および無機塩基または有機塩基から誘導され得る。30

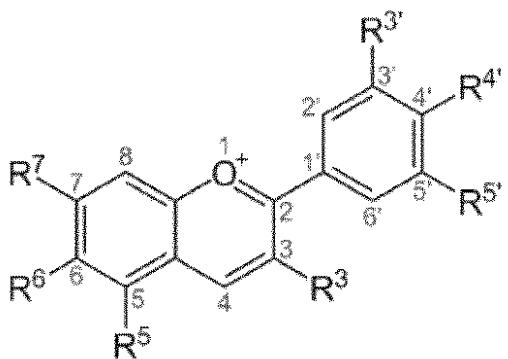
#### 【0020】

アントシアニジンであるデルフィニジンは、望ましくない成分が除去されたことを意味する、“純粋な形態”または“精製された形態”で使用され得る。40

#### 【0021】

“アントシアニジン”は、以下に示す基本構造を有する。

## 【化1】



10

## 【0022】

この式における置換基は、水素、ヒドロキシル基、およびメトキシ基からなる群より選択される。

## 【0023】

本発明のアントシアニジンであるデルフィニジンと複合体を形成し得るシクロデキストリンは、-1,4-グリコシド結合により結合したグルコース分子の環状オリゴ糖である。-シクロデキストリンは、7つのグルコース単位を有する。スルホアルキルエーテル-シクロデキストリンにおいて、グルコース単位のヒドロキシル基がスルホアルキルアルコールでエーテル化されている。本発明においては、一般的に、-シクロデキストリンの21個のヒドロキシル基の一部のみがエーテル化されている。スルホアルキルエーテル シクロデキストリンの製造は、当業者に周知であり、例えば、U.S. 5,134,127またはWO 2009/134347 A2に記載されている。

20

## 【0024】

スルホアルキルエーテル基は、その親水性または水溶性を増加させるために、先行技術においてシクロデキストリン中で用いられている。スルホアルキルエーテル基は、アントシアニジンおよび対応する置換-シクロデキストリンの複合体の安定性を増大するのに特に寄与し、従って、アントシアニジンの貯蔵安定性および製剤性(formulability)、特にその酸化に対する感受性を実質的に改善する。本発明の複合体は、以下により詳述される通り、貯蔵時安定な水溶液または固体として製剤され得る。

30

## 【0025】

本発明により、活性成分デルフィニジンを、驚くべきことに、活性成分の溶解性および安定性を増大させるスルホアルキルエーテル-シクロデキストリン、好ましくはスルホブチルエーテル-シクロデキストリン(SBE-CD)またはスルホエチルエーテル-シクロデキストリンと複合体形成することが特に好ましい。保護を要求する範囲を制限することなく、このことについての考えられる説明は、負に帯電したスルホブチル単位またはスルホエチル単位が、正に帯電したアントシアニジンであるデルフィニジンと静電的に相互作用し、アルキル基のうち、ブチル基またはエチル基が好適な立体相互作用を可能にするために最適な長さを有することである。ここで、デルフィニジンのような活性成分とスルホアルキルエーテル-シクロデキストリンとの複合体が、改善された溶解性および安定性をもたらすとの一般的に妥当な説明はできないことが注意されるべきである。現時点で、例えば、Ueda et al., "Evaluation of a スルホbutyl Ether Cyclodextrin as a Solubilizing/Stabilizing Agent for Several Drugs", Drug Development and Industrial Pharmacy, 24 (9), 863 - 867 (1998)の表1を引用することができ、そこに、種々の活性成分のみ、スルホブチルエーテル-シクロデキストリンとの複合体ならびに-シクロデキストリンとの複合体の溶解度が対比されている。そこに示される溶解度の値(SBE7-CD 対 -CD)から、試験した活性成分とスルホブチルエーテル-シクロデキストリンの複合体の3分の1に、正反対の結果が見られ、すなわち、活性成分およびスルホブチルエーテル-シクロデキストリンの複合体が、-シクロデキストリンとの複合体と比較して顕著に低い溶解度となる。

40

50

## 【0026】

スルホアルキルエーテル基によるシクロデキストリンの置換度は、好ましくは3～8、より好ましくは4～8、より好ましくは5～8、より好ましくは6～7である。6～7の平均置換度を有する好適なスルホブチルエーテル - - シクロデキストリンは、例えば、WO2009/134347A2に記載されており、商品名Capitol(登録商標)として市販されている。4～5、例えば4.2の置換度を有する対応するシクロデキストリンは、同様に使用することができる。

## 【0027】

本発明の複合体形態で用いるアントシアニジンはデルフィニジンである。化学構造は、以下の置換基パターンを有する上記の式に対応している。

10

## 【表1】

	R <sup>3'</sup>	R <sup>4'</sup>	R <sup>5'</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
デルフィニジン	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH

## 【0028】

本発明はまた、悪性黒色腫の処置のための医薬としての使用のための本発明の組成物の水溶液に関する。

## 【0029】

本発明の複合体、およびまた対応する水溶液の製造は、  
a)スルホアルキルエーテル - - シクロデキストリンの水溶液を調製し、  
b)アントシアニジンであるデルフィニジンを添加し、混合して複合体を製造する各工程を含む。

20

## 【0030】

工程a)において、5～10重量%の使用されるシクロデキストリンを含む水溶液を製造することが好ましい。本発明の文脈において、水溶液のpHが、デルフィニジンの添加中または添加後、好ましくは添加前に、pH7以下、好ましくは6以下、より好ましくは5以下、より好ましくは4～5に調整されているとき、特に好ましい。このpHで、より高い濃度の複合体水溶液を製造することが可能であることが示された。

## 【0031】

30

塩化物として計算されるデルフィニジンの濃度は、好ましくは少なくとも0.5mg/ml、より好ましくは少なくとも1.0mg/ml、より好ましくは少なくとも1.5mg/ml、より好ましくは2.0mg/mlである。好ましい態様において、少なくとも2.0mg/mlの特に好ましい濃度範囲は、特に、4～5の間のpHを有する水溶液で達成され得る。

## 【0032】

製造の文脈上、水溶液の成分の混合は、2～20時間の混合のための好ましい時間の攪拌により達成され得る。混合は、好ましくは、光により誘発される酸化を避けるために暗所で行われる。

## 【0033】

40

本発明はさらに、上記の本発明の水溶液から溶媒を除去することにより、本発明により得られ得る、悪性黒色腫の処置における医薬としての使用のための固体に関する。該除去は、好ましくは凍結乾燥によって達成され得る。本発明の水溶液医薬および薬用固体の両方は、良好な貯蔵安定性を有する。

## 【0034】

本発明は、限定されることなく、添付の図面を参照して、以下の実施例でさらに説明され得る。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

【図1】図1は、デルフィニジン - SBE - - CD処理(b)および未処理(a)のヒ

50

トメラノーマ細胞株 A - 375 細胞のヒストグラムを示す。

【図 2】図 2 a は、sub-G1 ピーク法により決定される、対照の SBE - - CD、DMSO および未処理の低細胞密度での A - 375 細胞と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD およびデルフィニジン C1 によるアポトーシスの用量依存的誘導を示す。図 2 b は、sub-G1 ピーク法により決定される、デルフィニジン C1 ならびに対照の SBE - - CD、DMSO および未処理の高細胞密度での A - 375 細胞と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD によるアポトーシスの用量依存的誘導を示す。

【図 3】図 3 a は、WST-1 アッセイにより決定される、対照の SBE - - CD、DMSO および未処理の低細胞密度での A - 375 細胞と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD およびデルフィニジン C1 の細胞生存率に対する用量依存的効果を示す。

図 3 b は、WST-1 アッセイにより決定される、デルフィニジン C1 ならびに対照の SBE - - CD、DMSO および未処理の高細胞密度での A - 375 細胞と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD の細胞生存率に対する用量依存的効果を示す。

【図 4】図 4 は、未処理の A - 375 細胞ならびにデルフィニジン - SBE - - CD、デルフィニジン C1 および SBE - - CD で処理した A - 375 細胞の顕微鏡写真を示す。

【図 5】図 5 は、xCELLigence システムを用いた、未処理細胞と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD 処理した高細胞密度の A - 375 細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図 6】図 6 は、xCELLigence システムを用いた、未処理細胞と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD 処理した低細胞密度の A - 375 細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図 7】図 7 は、xCELLigence システムを用いた、未処理細胞と比較した、デルフィニジン C1 処理した高細胞密度の A - 375 細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図 8】図 8 は、xCELLigence システムを用いた、未処理細胞と比較した、デルフィニジン C1 処理した低細胞密度の A - 375 細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図 9】図 9 は、xCELLigence システムを用いた、未処理細胞と比較した、SBE - - CD 処理した高細胞密度の A - 375 細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図 10】図 10 は、xCELLigence システムを用いた、未処理細胞と比較した、SBE - - CD 処理した低細胞密度の A - 375 細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図 11】図 11 a は、sub-G1 ピーク法により決定される、低細胞密度での対照（未処理細胞または TRAIL のみで処理した細胞）と比較した、TRAIL の有無下におけるデルフィニジン - SBE - - CD によるアポトーシス誘導を示す。図 11 b は、sub-G1 ピーク法により決定される、高細胞密度での対照（未処理細胞または TRAIL のみで処理した細胞）と比較した、TRAIL の有無下におけるデルフィニジン - SBE - - CD によるアポトーシス誘導を示す。

【図 12】図 12 a は、WST-1 アッセイにより決定される、低細胞密度でのデルフィニジン - SBE - - CD のみおよび対照（未処理細胞または TRAIL のみで処理した細胞）と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD と TRAIL 処理の細胞生存率に対する効果を示す。図 12 b は、WST-1 アッセイにより決定される、高細胞密度でのデルフィニジン - SBE - - CD のみおよび対照（未処理細胞または TRAIL のみで処理した細胞）と比較した、デルフィニジン - SBE - - CD と TRAIL 処理の細胞生存率に対する効果を示す。

【図 13】図 13 は、未処理の A - 375 細胞、TRAIL のみで処理した A - 375 細胞、デルフィニジン - SBE - - CD のみで処理した A - 375 細胞およびデルフィニジン - SBE - - CD と TRAIL で処理した A - 375 細胞の顕微鏡写真を示す。

10

20

30

40

50

【図14】図14は、xCELLigenceシステムを用いた、未処理細胞と比較した、TRAIL処理、デルフィニジン-SBE-CD処理、TRAILおよびデルフィニジン-SBE-CD処理した高細胞密度のA-375細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図15】図15は、xCELLigenceシステムを用いた、未処理細胞と比較した、TRAIL処理、デルフィニジンC1処理、TRAILおよびデルフィニジンC1処理した高細胞密度のA-375細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図16】図16は、xCELLigenceシステムを用いた、未処理細胞と比較した、TRAIL(0.02μg/ml)処理、SBE-CD(30μg/ml)処理、TRAIL(0.02μg/ml)およびSBE-CD(30μg/ml)処理した高細胞密度のA-375細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。  
10

【図17】図17は、xCELLigenceシステムを用いた、未処理細胞と比較した、TRAIL(0.02μg/ml)処理、SBE-CD(1000μg/ml)処理、TRAIL(0.02μg/ml)およびSBE-CD(1000μg/ml)処理した高細胞密度のA-375細胞の細胞数および細胞増殖（リアルタイム細胞モニタリング）を示す。

【図18】図18は、ATPルミネッセンスアッセイを用いた、活性成分不含有対照培地と比較した、0.1μM、3.2μMおよび100μM濃度のデルフィニジンC1およびデルフィニジン-SBE-CD複合体の内皮細胞の細胞生存率に対する効果を示す。  
20

【図19】図19は、ATPルミネッセンスアッセイを用いた、活性成分不含有対照培地と比較した、0.1μM、3.2μMおよび100μM濃度のデルフィニジンC1およびデルフィニジン-SBE-CD複合体のヒト線維芽細胞の細胞生存率に対する効果を示す。

#### 【実施例】

##### 【0036】

###### 実施例

###### I. デルフィニジンおよびシクロデキストリンの複合体の製造

30

###### 1. 用いた材料：

以下のシクロデキストリンを用いる：

###### 【表2】

$\alpha$ -CD	ID No : CYL-2322
$\beta$ -CD	ID No : CYL-3190
$\gamma$ -CD	ID No : CYL-2323
(2-ヒドロキシプロピル)- $\beta$ -CD	ID No : L-043/07
スルホブチルエーテル $\beta$ -CD	ID No : 47K010111

40

塩化デルフィニジンは、Extrasynthese社から購入した。

##### 【0037】

###### 2. デルフィニジン含量の決定

逆相HPLC法を用いて、デルフィニジン含有組成物中の塩化デルフィニジン含量を決定した。この目的のために、以下の試薬を用いた。

精製水

クロマトグラフィー用メタノール

分析用ギ酸

用量測定用溶液としての1M塩酸。

50

## 【0038】

用いたカラムは、Waters X Bridge（商標） C18、35 μl、150 mm × 4.6 mm であった。

## 【0039】

移動相は以下の通りであった。

相A：水 950 ml、メタノール 50 ml、ギ酸 10 ml

相B：水 50 ml、メタノール 950 ml、ギ酸 10 ml。

## 【0040】

以下の勾配プログラムを用いた。

【表3】

10

時間 [分]	相Bの割合
0	0
5	0
25	60
30	100

停止時間：35分

アフターラン時間（ポストタイム）：8分

20

流速：1 ml / 分

注入量：20 μl

カラム温度：30 ± 2

UV/VIS 検出器：アッセイについて 530 μm、不純物の検出について 275 μm

積分：面積。

## 【0041】

溶液およびサンプル調製：

希釈溶液1：100 ml のメタノールおよび2.6 ml の1M HCl の混合物

希釈溶液2：100 ml の40% メタノールおよび2.6 ml の1M HCl の混合物。

30

キャリブレーション溶液：デルフィニジンの標準溶液を、10 ml フラスコに 10 mg の塩化デルフィニジンを秤量し、希釈溶液1 に溶解した。溶解後、溶液を希釈溶液2 で約10倍に希釈し、およそ 0.1 mg / ml 濃度の溶液を調製した。

## 【0042】

対照のキャリブレーション溶液と同じ方法で調製した。塩化デルフィニジンが溶液中で不安定であるため、該キャリブレーション溶液を直ちにHPLCにより分析した。

## 【0043】

試験溶液の製造：

本発明により製造された固体のデルフィニジン含量を決定するために（製造については、以下を参照のこと）、約 50 mg の本組成物を 10 ml フラスコに秤量した。次いで、これを希釈溶液2 に溶解し、さらに、約 0.1 mg / ml 濃度のデルフィニジンが達成されるまで、同じく希釈溶液2 で希釈した。

40

## 【0044】

サンプル中のデルフィニジン含量の決定を、記載の外部標準を用いてキャリブレーションを用いて、Agilent ChemStationソフトウェアを用いて計算した。

## 【0045】

実施例1：デルフィニジンとSBE - - CD の複合体形成

本実施例において、デルフィニジンと種々のシクロデキストリンの複合体形成および水溶液中の該複合体の溶解度を試験した。

## 【0046】

中性水溶液を、それぞれ 10 重量 % のシクロデキストリンを含むように製造した。 -

50

C D の溶解度が不十分なために、2重量%濃度のみを選択した。

【0047】

ガラス製フラスコに各5m1のシクロデキストリン水溶液および純水を入れた。その後、過剰量の塩化デルフィニジンを添加した。必要とされる過剰量は、- - - および- - シクロデキストリン溶液に対して10mg、H P B C D (- - ヒドロキシプロピル- - シクロデキストリン)およびS B E - - C D の溶液に対して15mgであった。

【0048】

懸濁液を暗所で30にて20時間攪拌した。次いで、該懸濁液を、0.22μm孔径の膜フィルターを通して濾過した。

【0049】

得られた溶解度を、以下の表に示す。

【表4】

シクロデキストリン	シクロデキストリン濃度	塩化デルフィニジン
-	0	0.07mg/m1
α-CD	10%	0.14mg/m1
β-CD	2%	0.05mg/m1
γ-CD	10%	0.21mg/m1
H P B C D	10%	0.19mg/m1
S B E - β - C D	10%	0.66mg/m1

10

20

【0050】

複合体形成およびそれによりもたらされる溶解度の増加が、他のシクロデキストリン類よりもS B E - - C D でより優れていることが明らかである。

【0051】

実施例2:p Hの影響

本実施例において、水溶液へのデルフィニジン-S B E - - C D の溶解度に対するp Hの影響を試験した。S E B - - C D の水溶液を実施例1の方法に従って製造し、これらの溶液を、表2に記載の酸性p H値に1M H C lで調整した。その後、塩化デルフィニジンを実施例1の方法に従って添加し、攪拌時間が2.5時間までに制限されることを除いて、さらに処理した。結果を以下の表に示す。

30

【表5】

p H	塩化デルフィニジン
6.0	0.60mg/m1
4.8	2.12mg/m1
4.1	2.03mg/m1

【0052】

4から5の間のp H値にて、複合体塩化デルフィニジンの溶解度が、中性p Hと比較して、約3倍増加することが見出された。

40

【0053】

実施例3:本発明の固体の製造

本実施例において、本発明の複合体は、固体として製剤される。比較のため、デルフィニジン/H P B C D 複合体およびデルフィニジン/デンプン製剤を固体形態で製造する。

【0054】

実施例3.1:デルフィニジン-S B E - - C D

5gのS E B - - C D を40m1の蒸留水に溶解し、透明な溶液を得た。該溶液のp Hを、1M H C lを用いて4.8に調整した。次いで、0.11gの塩化デルフィニジンを添加し、混合物を暗所で27にて2時間攪拌した。均一な液体を、孔径0.45μ

50

mの膜フィルターを通して真空下で濾過した。溶液を凍結し、その後、-48および約10.3Pa(77mTorr)の圧力下で凍結乾燥させた。凍結乾燥物を粉碎し、0.3mmメッシュサイズの篩にかけた。

#### 【0055】

##### 実施例3.2：デルフィニジン/H P B C D

かなりの量の材料を濾過する以外、本実施例を実施例3.1と同様に行い、実施例3.1のS B E - - C Dを用いるよりも溶解度が顕著に低かったことが示された。

#### 【0056】

##### 実施例3.3：デルフィニジンデンプン製剤

5gのデンプンを40mlの蒸留水中に懸濁した。白色懸濁液を得た。該溶液のpHを1M HClを用いて4.6に調整した。次いで、0.11gの塩化デルフィニジンを添加し、混合物を暗所で27にて2時間攪拌した。得られた均一な液体を、実施例3.1に記載の通り、凍結乾燥させて、固体を粉碎し、篩過した。

実施例3.1は本発明によるものであり、実施例3.2および3.3は比較例である。

#### 【0057】

##### 実施例4：安定性試験

実施例3.1から3.3の固体を以下の条件下で貯蔵した。

- 褐色のねじ式ガラス容器中、室温にて8日間、
- その後、酸素雰囲気下の暗所で、ガラス容器中、室温にて22日間。

#### 【0058】

上記の貯蔵のうち後半の22日間は、20ml容量のガラスバイアル中で行った。各場合において、予め8日間貯蔵した250mgのサンプルをそこに入れ、該バイアルをゴム栓で密封した。2本の注射針により、バイアルの上部空間に純粋な酸素を入れた。その後、サンプルを暗所で貯蔵した。

#### 【0059】

固体のデルフィニジン含有量（塩化デルフィニジンとして計算され、重量%で記載される）を、上記のHPLC法により決定した。結果を以下の表に示す。

#### 【表6】

	経過時間(日)				
	開始時	2	8	19	30
実施例3.1	1.69	1.52	1.55	1.40	0.93
実施例3.2	1.30	1.20	1.14	1.03	0.68
実施例3.3	1.60	1.59	1.56	1.53	1.15

#### 【0060】

結果は、純粋な酸素雰囲気下でも高い安定性を有し、従って良好な貯蔵適正を有するデルフィニジン複合体が本発明により製造され得ることを示す。該複合体はまた、水溶液で、特にわずかに酸性の溶液で良好な溶解性を有し、デルフィニジンは、種々の方法で本発明により製剤され得る。本発明の固体の安定性は、デンプンを含む製剤（実施例3.3）と同程度に良好であるが、この比較例は、水溶液として製剤され得ない。

#### 【0061】

##### 実施例5：水溶液における安定性試験

デルフィニジン含有溶液中の塩化デルフィニジン含量を決定するために、逆相HPLC法を上記のものと同様に用いた。以下の反応材をこの実施例において用いた。

精製水

クロマトグラフィー用メタノール

分析用ギ酸

用量測定用溶液としての1M塩酸。

#### 【0062】

10

20

30

40

50

用いたカラムは、Waters X Bridge（商標）C18、35 μl、150 mm × 4.6 mm であった。

#### 【0063】

移動相は以下の通りであった。

相A：水 770 ml、メタノール 230 ml、ギ酸 10 ml

相B：水 50 ml、メタノール 950 ml、ギ酸 10 ml。

#### 【0064】

以下の勾配プログラムを用いた。

【表7】

時間 [分]	相Bの割合
0	0
5	0
20	20
25	100

10

停止時間：25分

アフターラン時間（ポストタイム）：8分

流速：1 ml / 分

20

注入量：20 μl

カラム温度：30 ± 2

UV/VIS 検出器：アッセイについて 530 μm、不純物の検出について 275 μm

積分：面積。

#### 【0065】

溶液およびサンプル調製：

希釈溶液1：100 ml のメタノールおよび2.6 ml の1M HCl の混合物

希釈溶液2：100 ml の50% メタノールおよび2.6 ml の1M HCl の混合物。

キャリブレーション溶液：デルフィニジンの標準溶液を、10 ml フラスコに 10 mg の

塩化デルフィニジンを秤量し、希釈溶液1 に溶解した。溶解後、溶液を希釈溶液2 で約 1

0倍に希釈し、およそ 0.1 mg / ml 濃度の溶液を調製した。

30

#### 【0066】

対照キャリブレーション溶液と同じ方法で調製した。塩化デルフィニジンが溶液中で不安定であるため、該キャリブレーション溶液を直ちに HPLC により分析した。

#### 【0067】

試験溶液の製造：

本発明の水溶液のデルフィニジン含有量を決定するために、実施例3.1（本発明）のデルフィニジン / SBE - CD およびデルフィニジン（比較例）を、1.584 mg / ml（本発明実施例）または 0.0216 mg / ml（比較例）の開始濃度（デルフィニジンに基づく）が達成されるまで、0.9% NaCl 溶液中に溶解した。溶液を室温で製造し、その後、暗所で、37 ℃ にて密閉バイアル中に貯蔵した。

40

#### 【0068】

デルフィニジン含量を、1、2、3 および 4 時間後に決定した。以下の表は、上記の開始濃度に対する割合として決定された含量を示す。

【表8】

時間 [時]	非複合体化デルフィニジン	デルフィニジン/SBE-β-CD
0	100%	100%
1	8.3%	80.7%
2	6.5%	74.5%
3	5.6%	64.7%
4	5.1%	62.8%

## 【0069】

10

サンプル中のデルフィニジン含量の決定を、記載の外部標準を用いてキャリブレーションを用いて、Agilent ChemStationソフトウェアを用いて計算した。

## 【0070】

I I . メラノーマ細胞に対するデルフィニジンおよびデルフィニジン - SBE - - CD 複合体の効果

試験細胞株

以下に記載のインビトロ実験において、デルフィニジンとスルホブチルエーテル - シクロデキストリン複合体（以降、デルフィニジン - SBE - - CD）およびデルフィニジンの効果を、ヒトメラノーマ細胞株 A - 375 モデルを用いて試験した[ATCC Catalog No. CRL-1619; Bruggen J., Sorg C. (1983) Detection of phenotypic differences on human malignant melanoma lines and their variant sublines with monoclonal antibodies. Cancer Immunol Immunother 15: 200 - 205]。 20

## 【0071】

細胞株を、10% FCS（ウシ胎仔血清）および抗生物質を添加した D M E M（ドイツ、カールスルーエ、Gibco社のダルベッコの修飾イーグル培地）中、37°、5% CO<sub>2</sub> にて培養した。

## 【0072】

## 実施例 6

## (sub-G1 ピーク法を用いる、アポトーシス誘導の測定)

実施例 6 の実験において、試験細胞株におけるアポトーシスの誘導について試験した物質の効果を、sub-G1 ピーク法、通常、技術文献において“Nicoletti method”と呼ばれる方法を用いて試験した[Riccardi C. Nicoletti I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat. Protoc. 1: 1458 - 1461]。 30

## 【0073】

この方法は、生存細胞と比較して、アポトーシス細胞のより低いDNA含量に基づく。アポトーシスの特徴は、エンドヌクレアーゼによる、短いDNAフラグメントへのDNAの切断であって、ここで、生存細胞と比較して、アポトーシス細胞において低分子量DNA含量が増加し、高分子量DNAの割合が低下する。細胞膜の誘導された溶解（膜透過化）は、アポトーシス細胞から低分子量DNAフラグメントを漏出する。細胞をDNAインターカレート色素であるヨウ化プロピジウム（PI）で染色するとき、アポトーシス細胞は生存細胞よりも弱い蛍光強度を示し、アポトーシス細胞核内でのフローサイトメトリーによって決定されたDNA含量は、広範な、低二倍体の、より弱い蛍光DNAピーク（sub-G1 ピーク）を明らかにし、それは、二倍体DNA含量を有する健常な細胞の狭い2倍のDNAのピークとは容易に区別することができる。この一例を図1のヒストグラム a および b に示す。ヒストグラム a は、未処理の PI 染色した細胞を示す。ヨウ化プロピジウムはDNAに組み込まれ、2つの狭いピーク、1倍のDNA含量を有する G1 期の細胞（左ピーク）および二倍体DNA含量を有する G2 期の細胞（右ピーク）で蛍光を発する。左のピークの上流の sub-G1 ピークは、実質的には存在しない。対照的に、ヒストグラム b は、広範な sub-G1 ピークを示す。これは、デルフィニジン - SBE - - CD で処理した 24 時間後のアポトーシス細胞核の割合を示す。 40

50

## 【0074】

実施例6のsub-G1ピーク法を実施するために、細胞を1m1の細胞懸濁液当たり10-3000μgのデルフィニジン-SBE--CDまたは15-120μMの精製した塩化デルフィニジン(以降、デルフィニジンC1)と共に24時間インキュベートし、そこで、複合体パートナーであるSBE--CDおよびまたDMSOで処理した細胞、ならびに未処理細胞を対照とした。それぞれの個々の試験のために(対照、デルフィニジン-SBE--CD、SBE--CD、デルフィニジンC1)、ウェルプレート上の3つの3m1ウェルに細胞を準備した。その後、細胞をトリプシン処理により回収し、氷冷したリン酸緩衝生理食塩溶液(PBS)で洗浄し、0.1%クエン酸ナトリウム、0.1%トライトンX-100およびPI(40μg/m1; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)を含む染色緩衝液を用いて1時間インキュベートし、その後、フローサイトメトリー(FACSCaliburおよびCellQuestソフトウェア; Becton Dickinson, Heidelberg)により細胞核のDNA含量を測定および評価した。平均値は、トリプリケートの測定値それぞれから計算され、ここで、対象細胞について測定された値をt検定のための基準として用いた。

## 【0075】

低い自発的アポトーシス率(バックグラウンドアポトーシス)が、アポトーシス測定中に発生し得ることが知られており、この作用は、細胞が既に増殖停滞期に達し、栄養および酸素の欠乏に直面している場合に、特に発生する。これを考慮するために、指数増殖期の細胞を測定し、実験を、低い(低細胞密度)および高い細胞密度(高細胞密度)の両方で並行して行い、結果を図2a(低細胞密度)および図2b(高細胞密度)に示す通り図示した。

## 【0076】

実験結果

- 精製したデルフィニジンC1は、アポトーシスの有意な用量依存的誘導を示す(図2a参照、120μM)。
- デルフィニジン-SBE--CD複合体は、アポトーシスの明らかに強力な誘導を示す(図2a参照、1000μg/m1、および図2b参照、3000μg/m1)。
- 一方、複合体パートナーSBE--CDおよびまたDMSOは、未処理の対照細胞と同様に、何の効果も示さない。

## 【0077】

実施例7

## (細胞生存率テスト)

実施例7の実験において、試験細胞株の細胞生存率に対する試験した物質の効果を、Roche Diagnostics社からのWST-1アッセイ(水溶性テトラゾリウム)を用いて定量した。WST-1アッセイは、細胞中の無傷の呼吸鎖(respiratory chain)を検出するように設計されており、無傷のミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウムデヒドロゲナーゼシステムを有する生存細胞は、弱赤色のテトラゾリウム塩WST-1(4-[3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-2H-5-テトラゾリオ]-1,3-ベンゼンジスルホネート)から暗赤色のホルマザンへの酵素的変換を生じる。この色の変化は、分光光度計で光度測定し、評価することができる。

## 【0078】

実施例7のWST-1アッセイを行うために、細胞を、実施例6と同様に、1m1の細胞懸濁液当たり10-3000μgのデルフィニジン-SBE--CDまたは15-120μMの精製されたデルフィニジンC1と共に24時間インキュベートし、ここで、複合体パートナーSBE--CDおよびまたDMSOで処理された細胞、ならびに未処理細胞を対照とした。Ploetz et al. (2012), Mutual Regulation of Bcl-2 Proteins Independent of the BH3 Domain as Shown by the BH3-Lacking Protein Bcl-xAK, PLOS ONE, vol 7, issue 4, e34549に詳細に記載のようなWST-1アッセイにおいて、例えば、カルセインAMでの染色は、血清不含有増殖培地中、37にて60分間、カルセイ

10

20

30

40

50

ン (4 μ ; e Bioscience, Frankfurt, Germany) と共にインキュベートして行い、P B S で洗浄し、その後、細胞生存率の測定を、カルセイン染色 (生存) 細胞と染色されていない (死) 細胞を区別するために、フローサイトメトリーにより行った (実施例 5 参照)。

#### 【0079】

実施例 6 と同様に、実施例 7 における試験はまた、低い細胞密度 (低細胞密度) およびより高い細胞密度 (高細胞密度) の両方で行い、その結果を、図 3 a (低細胞密度) および 3 b (高細胞密度) に示す通り図示する。

#### 【0080】

##### 試験結果

10

- 精製したデルフィニジン C 1 は、低細胞密度で用量の増加に伴い生存細胞の喪失を示す (図 3 a 参照)。
- デルフィニジン - S B E - - C D 複合体は、細胞生存率の明らかに高度かつ顕著な喪失を引き起こす (1000 μg / m l および 2000 μg / m l について図 3 a、および 3000 μg / m l について図 3 b 参照)。
- 一方、複合体パートナーである S B E - - C D およびまた D M S O は、何の効果も示さず、未処理の対照細胞と同様である。

#### 【0081】

アポトーシスの誘導を超える生存細胞の喪失の効果 (実施例 6) はまた、処理の 24 時間後に顕微鏡分析下での細胞の形態にも反映されており、高濃度のデルフィニジン C 1 またはデルフィニジン - S B E - - C D での細胞は、図 4 の顕微鏡写真から明らかなように、球状および / または分離している。

20

#### 【0082】

##### 実施例 8

###### [リアルタイム細胞分析 - R T C A ]

実施例 6 および 7 と同様に、同じ活性成分の試験における細胞数および細胞増殖を、*x C E L L i g e n c e* システム (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてリアルタイムで記録した。*x C E L L i g e n c e* システムは、リアルタイムに動的な細胞データを提供する、細胞ベースの無標識分析のための超小型バイオセンサーシステムである。*x C E L L i g e n c e* システムの培養プレートは、電気的インピーダンスの変化を測定するために、各ウェルの底に微小電極を備えている。インピーダンスの量的变化は、下層の電極を用いて細胞接触の数および強度と相関する。

30

#### 【0083】

デルフィニジン - S B E - - C D は、高率のアポトーシス (実施例 6) および細胞生存率の低下 (実施例 7) による細胞増殖の完全な低下を示し (図 5 および 6 参照)、特に図 5 の濃度 1000 μg / m l から強い抗増殖作用が示され、図 6 の濃度 500 μg / m l から細胞増殖の完全な阻害が示される。

#### 【0084】

同様に強力な抗増殖作用が、60 - 120 μM のデルフィニジン C 1 で見られ (図 7 および 8 参照)、予期される通り、未処理細胞および D M S O 対照は、ほぼ中立的な挙動であり (図 7 - 10 参照)、すなわち、上記の抗増殖作用は、試験された活性成分であるデルフィニジン - S B E - - C D およびデルフィニジン C 1 に特異的に起因している。

40

#### 【0085】

I I I . デルフィニジンおよびデルフィニジン - S B E - - C D 複合体と T R A I L の組み合わせ剤のメラノーマ細胞に対する効果

##### 用いる試験細胞株および方法

同じ細胞株および方法を、上記セクション I I のとおりに実験に用いた。

#### 【0086】

##### 実施例 9

50

( s u b - G 1 ピーク法を用いるアポトーシスの誘導の測定 )

実施例 9 に記載の実験において、デルフィニジン - S B E - - C D 複合体とアポトーシス促進性細胞死リガンドである T R A I L の組み合わせの効果を、中程度のアポトーシス感受性のみを有する細胞株 A - 3 7 5 に対して、 s u b - G 1 ピーク法を用いて試験した。 s u b - G 1 ピーク法を実施例 9 の通りに実施するために、細胞を、細胞懸濁液 1 m l 当たり 3 0 - 1 0 0 0  $\mu$  g のデルフィニジン - S B E - - C D と共に、細胞懸濁液 1 m l 当たり 0 . 0 2  $\mu$  g の T R A I L の有無下で 2 4 時間インキュベートし、ここで複合体パートナーである S B E - - C D で処理した細胞および未処理細胞を対照として用いた。実験を、低い(低細胞密度)およびより高い細胞密度(高細胞密度)の両方で並行して行い、結果を図 1 1 a (低細胞密度)および図 1 1 b (高細胞密度)に示す通り図示した。

#### 【 0 0 8 7 】

##### 実験結果

- デルフィニジン - S B E - - C D と T R A I L の組み合わせにおいて、アポトーシスの誘導は、試験した全てのデルフィニジン - S B E - - C D 濃度でデルフィニジン - S B E - - C D のみに関して増加した。
- アポトーシス誘導の増加は、同様に、高濃度のデルフィニジン - S B E - - C D にて、 T R A I L のみに対してデルフィニジン - S B E - - C D と T R A I L の組み合わせについて顕著に増加した。
- 一方、複合体パートナーである S B E - - C D は、対照レベルである。

#### 【 0 0 8 8 】

##### 実施例 1 0

##### ( 細胞生存率試験 )

実施例 1 0 の実験において、試験細胞株の細胞生存率は実施例 7 と同様に試験し、相違点は、細胞がデルフィニジン - S B E - - C D 複合体および T R A I L の組み合わせに暴露されたことである。

#### 【 0 0 8 9 】

実施例 7 と同様のアッセイを実施するために、細胞を、1 m l の細胞懸濁液当たり 3 0 - 1 0 0 0  $\mu$  g のデルフィニジン - S B E - - C D と共に、細胞懸濁液 1 m l 当たり 0 . 0 2  $\mu$  g の T R A I L の有無下で 2 4 時間インキュベートし、ここで複合体パートナーである S B E - - C D で処理した細胞および未処理細胞を対照として用いた。

#### 【 0 0 9 0 】

実施例 1 0 における実験はまた、実施例 9 と同様に、低い(低細胞密度)およびより高い細胞密度(高細胞密度)の両方で行い、結果を図 1 2 a (低細胞密度)および図 1 2 b (高細胞密度)に示す通り図示した。

#### 【 0 0 9 1 】

##### 実験結果

- デルフィニジン - S B E - - C D と T R A I L の組み合わせにおいて、細胞生存率は、試験した全てのデルフィニジン - S B E - - C D 濃度でデルフィニジン - S B E - - C D のみに関して低下する。
- 細胞生存率の低下は、同様に、高濃度のデルフィニジン - S B E - - C D にて、 T R A I L のみに対して、デルフィニジン - S B E - - C D と T R A I L の組み合わせについて明らかである。
- 一方、複合体パートナーである S B E - - C D は、対照レベルである。

#### 【 0 0 9 2 】

アポトーシスの誘導を超える生存細胞の喪失の効果(実施例 9 )はまた、処理の 2 4 時間後に顕微鏡分析下での細胞の形態にも反映されており、デルフィニジン - S B E - - C D に加えて T R A I L の使用は、図 1 3 の顕微鏡写真から明らかのように、細胞のより球状および / または分離を引き起こす。

#### 【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

**実施例 1 1****(リアルタイム細胞分析 - R T C A )**

実施例 9 および 10 と同様に、同じ活性成分の試験における細胞数および細胞増殖を、ルフィニジン C 1 の組み合わせを T R A I L の有無下でさらに添加して、*x C E L L i g e n c e* システム (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてリアルタイムで記録した。

**【 0 0 9 4 】**

T R A I L と組み合わせたデルフィニジン - S B E - - C D は、デルフィニジン - S B E - - C D 単独と比較して、アポトーシスの増加率 (実施例 9) およびより大きな細胞生存率の低下 (実施例 10) に従い、相乗的かつ強力な細胞増殖阻害を示す (図 14 参照)。細胞増殖のより強力な阻害はまた、T R A I L 単独およびデルフィニジン単独と比較して、デルフィニジン C 1 と T R A I L の組み合わせでも観察され得る (図 15 参照)。S B E - - C D による T R A I L 感受性の強化は観察されず (図 16 および 17 参照)、すなわち、上記の抗増殖作用の強化は、デルフィニジン - S B E - - C D の T R A I L との組み合わせにおいて試験された活性成分デルフィニジンに得意に起因するものである。

**【 0 0 9 5 】****I V . 細胞毒性の試験 - 細胞生存率に対するデルフィニジンおよびデルフィニジン - S B E - - C D 複合体の効果****実施例 1 2****(ヒト線維芽細胞および内皮細胞の生存性に対するデルフィニジンおよびデルフィニジン - S B E - - C D 複合体の効果)****【 0 0 9 6 】****用いた細胞**

用いた細胞は、ヒトドナーの皮膚由来の単離された線維芽細胞および微小血管内皮細胞の初代細胞であった。

**【 0 0 9 7 】**

線維芽細胞を単離するために、組織の細胞構造を、トリプシン - E D T A 溶液と共に 1 時間インキュベートすることにより溶解した。細胞剥離反応を停止するために、停止培地を皮膚に添加した。その後、皮膚片を P B S 中で 2 回スワール (Swirl) して集め、線維芽細胞の懸濁液とする。得られた線維芽細胞を 4 ℃ にて 5 分間、1 0 0 回転 / 分で遠心分離し、定量化後に用いた。

**【 0 0 9 8 】**

ヒト皮膚微小血管内皮細胞は、Hewett and Murray (1993) の当業者に公知の標準的方法により得られた [Hewett P. W. and Murray J. C. (1993) Immunomagnetic purification of human microvessel endothelial cells using Dynabeads coated monoclonal antibodies to PECAM-1. Eur J Cell Biol 62: 451 - 454; Hewett P. W. & Murray J. C. (1993) Human microvessel endothelial cells: Isolation, culture and characterization. In Vitro Cell Biol: 823 - 830]。

**【 0 0 9 9 】****用いた測定方法**

実施例 1 2 の実験において、ヒト線維芽細胞および内皮細胞の生存性に対する試験した物質の効果は、当業者に公知の A T P ルミネッセンスアッセイを用いて試験され、それを誤解をなくすために、以下に簡単にまとめる。

**【 0 1 0 0 】**

例えば、細胞毒性の活性成分の作用に起因する細胞死の後、細胞内 A T P 含量は、A T P a s e による分解のために大幅に減少する。従って、内生 A T P a s e の阻害により、溶解により遊離された A T P 含量は、生存細胞数の 1 つの尺度として用いられ得る。定量化のために、遊離した A T P は、酵素ルシフェラーゼにより触媒される反応に用いられ、ここで、基質ルシフェリンのオキシリシフェリン、二酸化炭素、A M P および無機リン酸

10

20

30

40

50

への A T P 依存性の酸化が、M g<sup>2+</sup> の存在下で、光を放出しながら起こる。A T P 含量と相関した放出される光の量を測定し、試験した細胞の生存率についての直接定量可能な結果を提供する。これは、サンプル中の A T P の量を反映する独立した単位である R L U (相対光単位) で測定される。A T P 決定のためのキットおよび装置は、当業者に公知で有り、例えは、スウェーデン、ハニング(Haning)のBiothema, AB社の A T P 試験キット、およびドイツ、ビルケンフェルトのSTRATEC Biomedical Systems AG社の持ち場こび可能なルミノメーターであるL um i n o (登録商標)である。細胞内 A T P を決定するために、試験すべき 50 μl のサンプルを、通常、ガラス管にピペットで移して、50 μl の抽出試薬 B / S を細胞溶解のためにそこに添加し、400 μl の A T P - H S 試薬を添加し、混合した後、密封管を自動測定および発光の評価のためにルミノメーターに配置した。

10

#### 【 0 1 0 1 】

本実施例の場合、活性成分で処理し、A T P ルミネッセンスアッセイに適用する前に、ダルベッコの修飾イーグル培地 (D M E M 培地) 中のヒト線維芽細胞または内皮細胞を、96 ウェルマイクロタイタープレートに播種し (5000 細胞 / ウェル) 、3 日間培養した。インキュベーター内で細胞を接着および増殖させた後、物質での処理を、1日目～4日目 (内皮細胞) および 4 時間、24 時間、48 時間および 96 時間の間隔 (線維芽細胞) で行い、ここで、100 μl の D M E M 培地中に溶解した活性成分デルフィニジン C 1 またはデルフィニジン - S B E - - C D 複合体は、種々の濃度で 3 つのウェルに添加された (0.1 μM ; 3.2 μM ; 100 μM)。物質不含有培地で処理した細胞を参照対照として用いた。3 時間後に物質の枯渇が生じ、その後、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (P B S) で洗浄した。終点測定を、実施例 7 にて上記の W S T - 1 アッセイを用いて行った。

20

#### 【 0 1 0 2 】

A T P ルミネッセンスアッセイの実験結果は、図 18 (内皮細胞) および図 19 (線維芽細胞) に図示され、以下の通りにまとめられる。

- デルフィニジン C 1 およびデルフィニジン - S B E - - C D は、ヒト線維芽細胞および内皮細胞に対して、試験した活性成分濃度 (0.1 - 100 μM) で顕著な細胞毒性作用を示さない。

#### 【 0 1 0 3 】

これは、癌を処置するための完全に新規な、かつ特に好適な活性成分群を明らかにし、一方では、試験した活性成分デルフィニジン C 1 およびデルフィニジン - S B E - - C D が癌細胞 (メラノーマ細胞) に対する所望の抗増殖作用を有し (実施例 6 - 1 1 )、他方では、実施例 12 に記載の通り、治療的に有効な濃度で一般的に予期される望ましくない非癌性細胞に対する細胞毒性作用 (副作用) を回避する。

30

【図1】

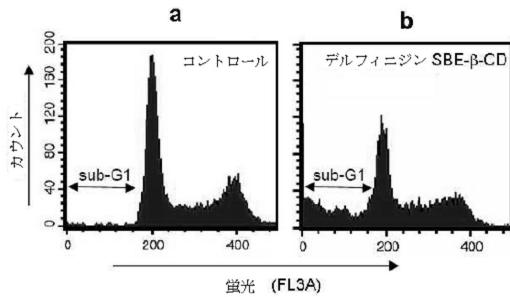


FIG. 1

【図2 a】

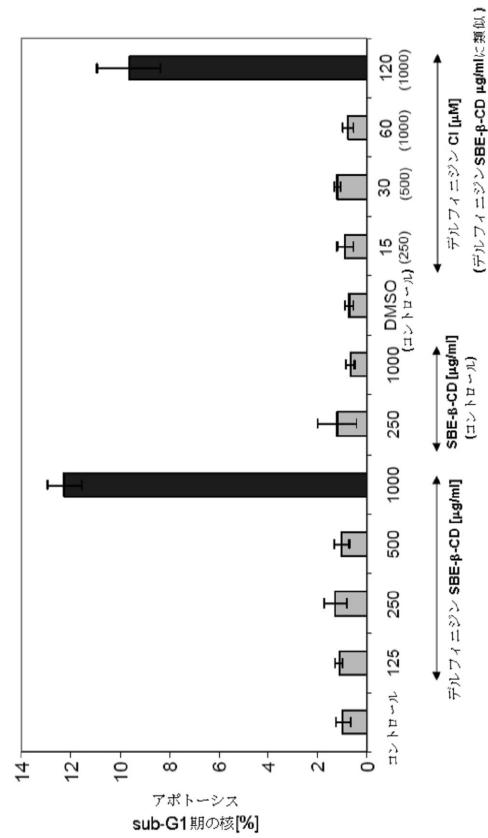


FIG. 2 a

【図2 b】

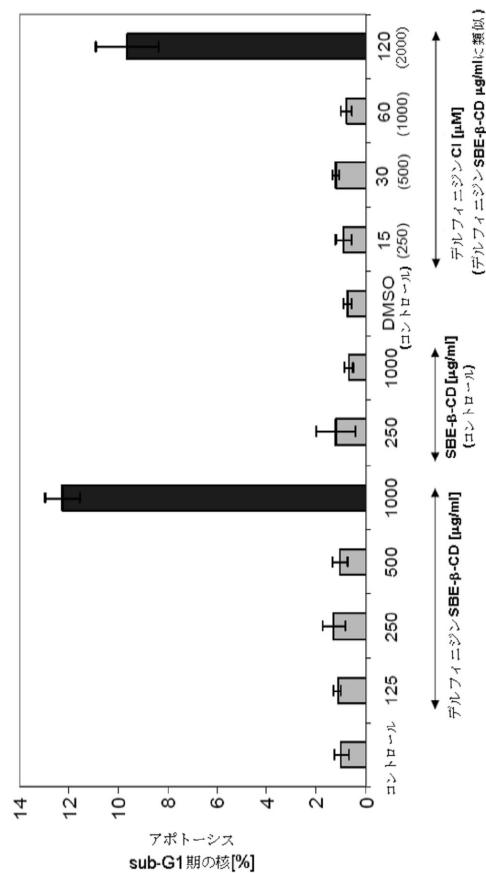


FIG. 2b

【図3 a】

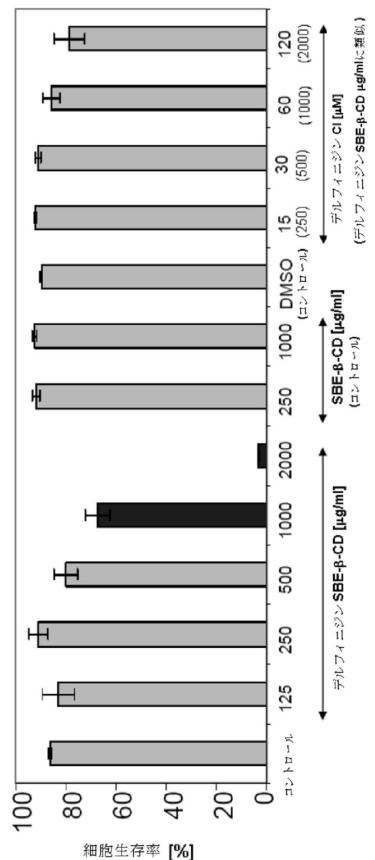


FIG. 3a

【図 3 b】

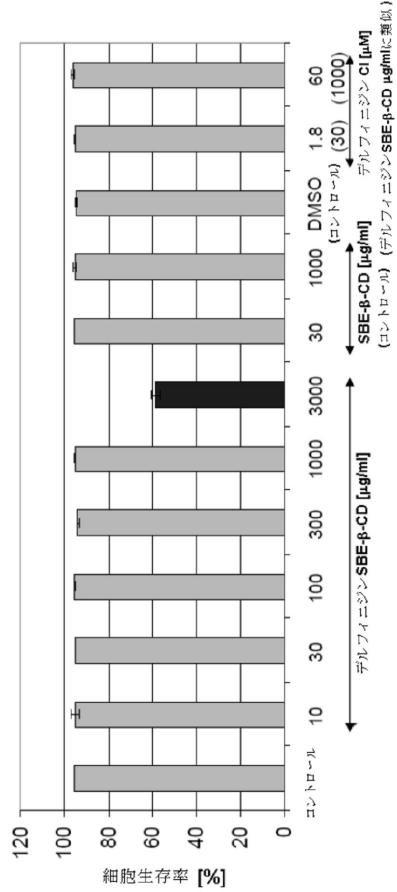


FIG. 3b

【図 4】

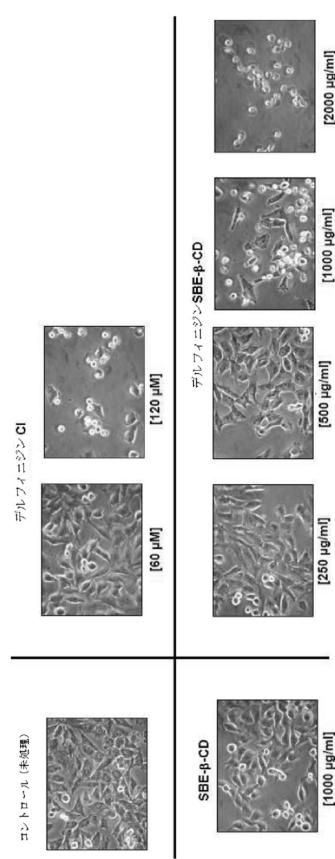


FIG. 4

【図 5】

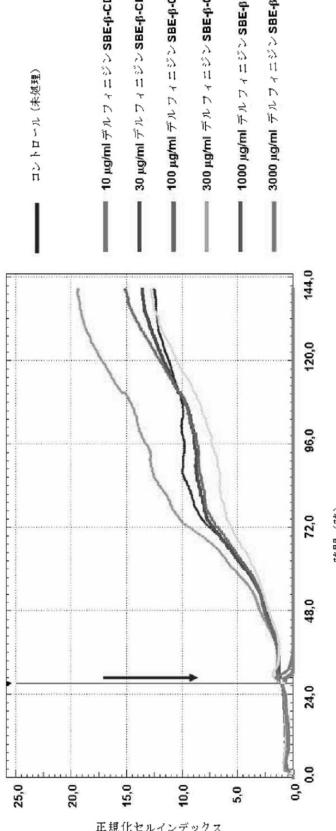


FIG. 5

【図 6】

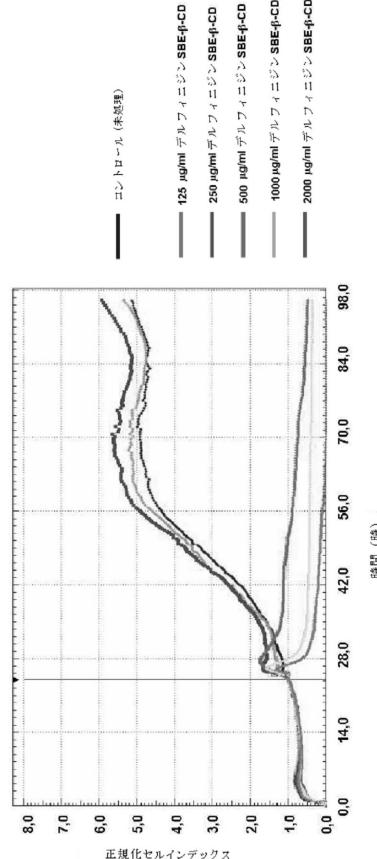


FIG. 6

【図7】

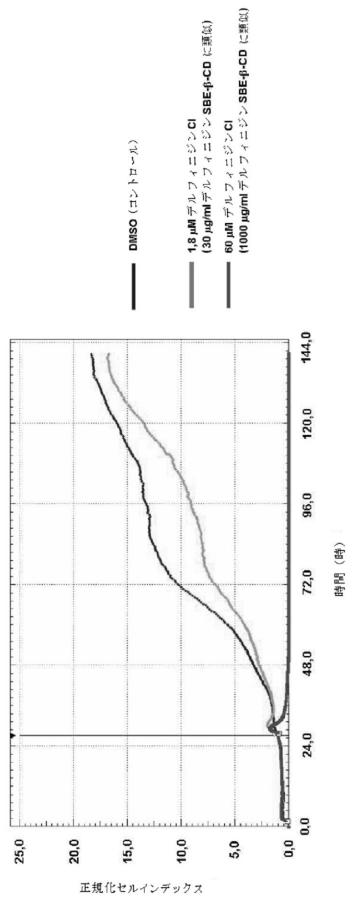


FIG. 7

【図8】

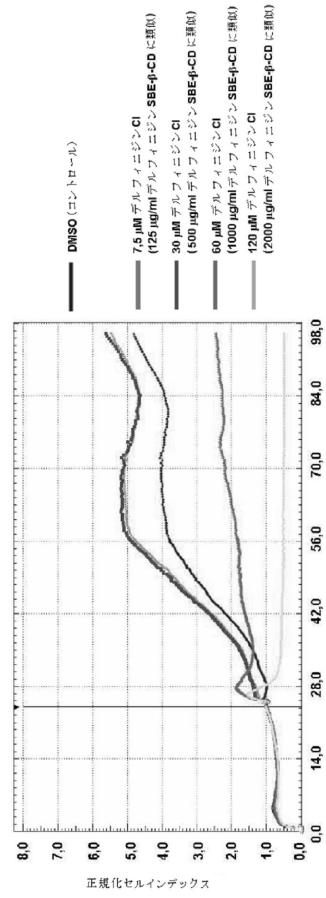


FIG. 8

【図9】

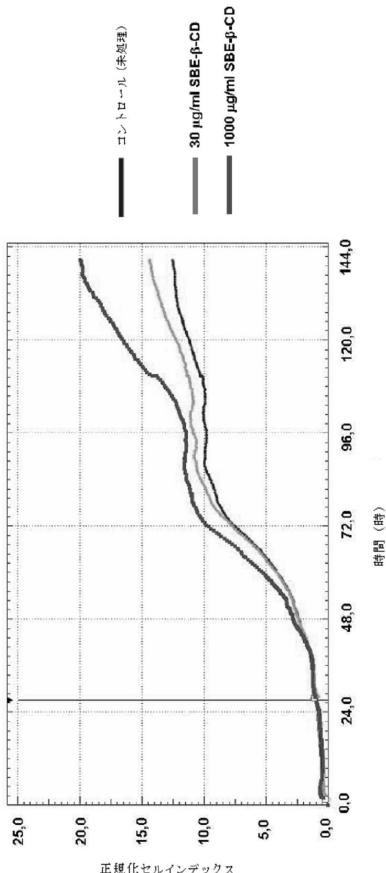


FIG. 9

【図10】

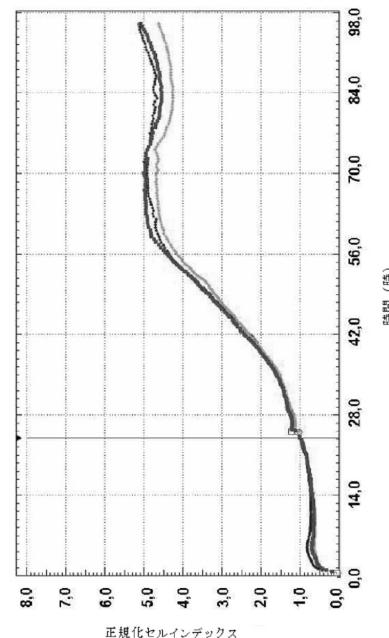


FIG. 10

【図 1 1】

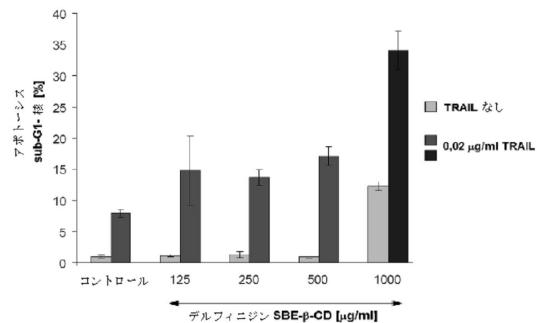


FIG. 11a

【図 1 2】

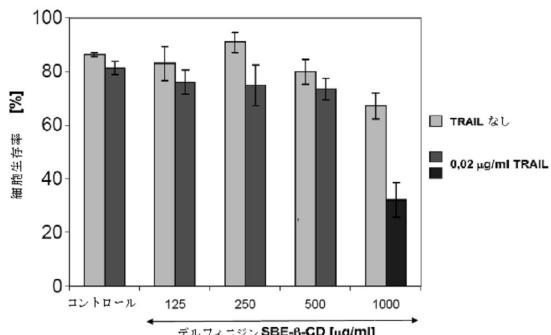


FIG. 12a

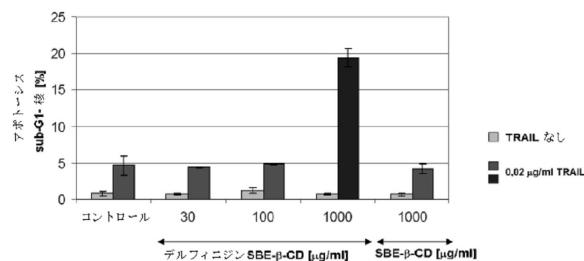


FIG. 11b

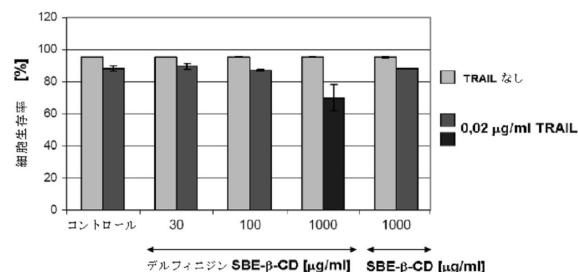


FIG. 12b

【図 1 3】

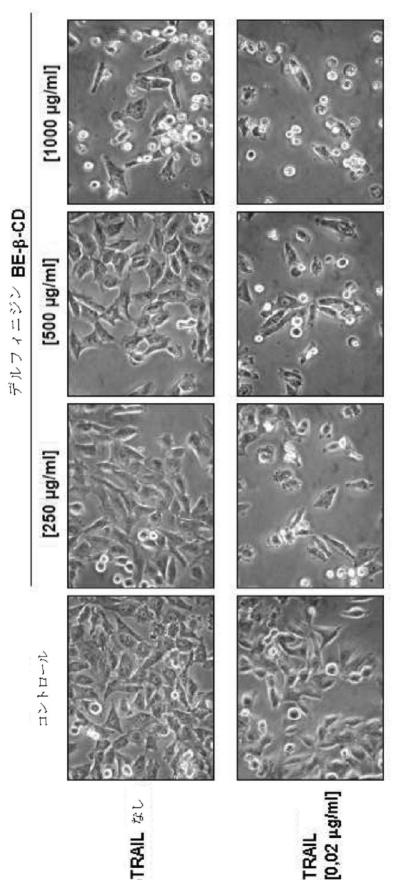


FIG. 13

【図 1 4】

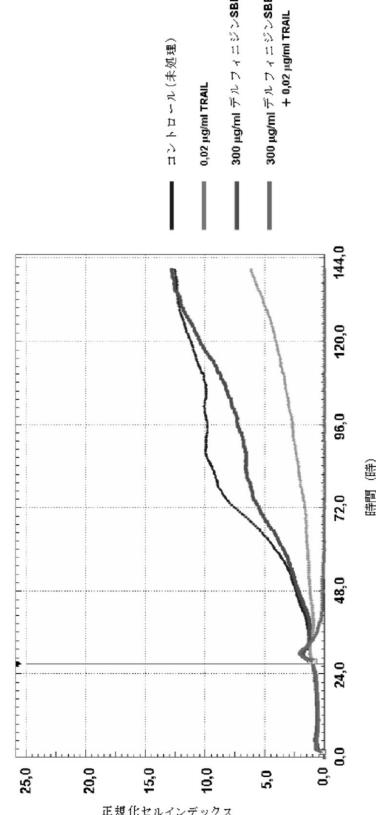


FIG. 14

【図 15】

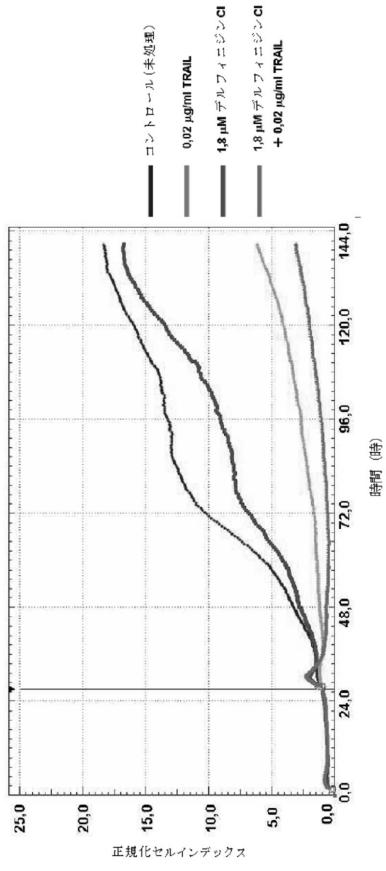


FIG. 15

【図 16】

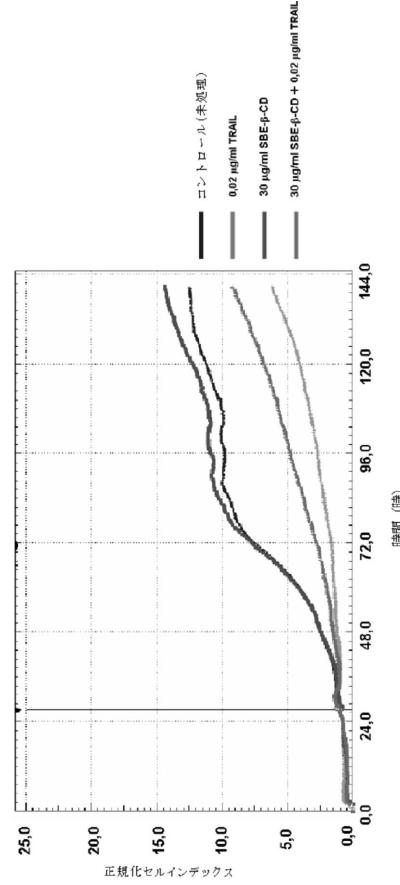


FIG. 16

【図 17】

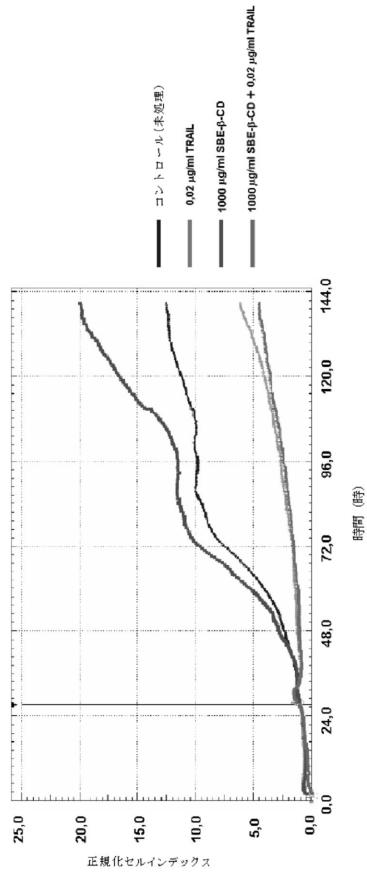


FIG. 17

【図 18】

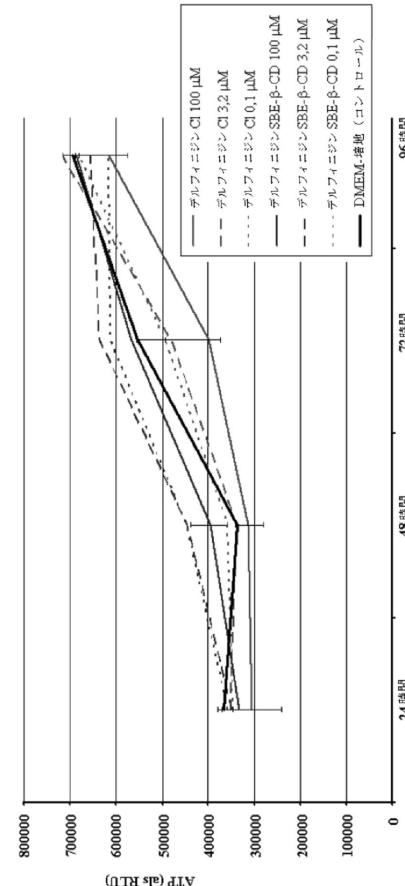


FIG. 18

【図 19】

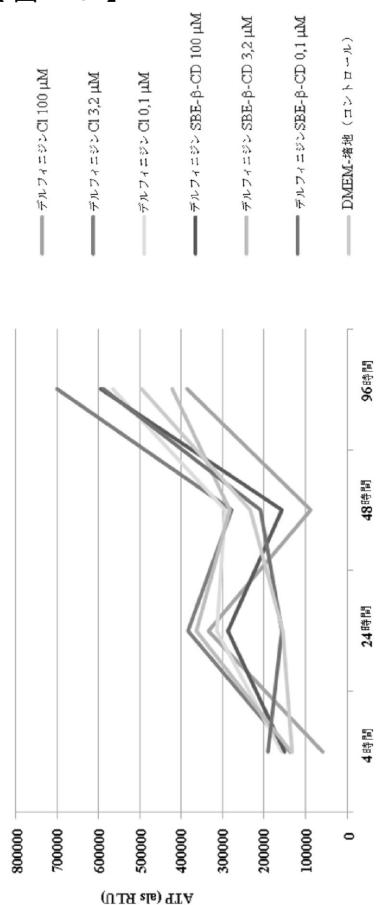


FIG 19

---

フロントページの続き

(72)発明者 ノルベルト・レーヴァー  
ドイツ 9 7 0 8 2 ヴュルツブルク、ニコラウスシュトラーセ 20 番  
(72)発明者 イエンス・プロシャイト  
ドイツ 9 7 2 0 9 ヴュルツブルク、ケルツエンライテ 35 番

審査官 今村 明子

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 3 9 1 9 3 (JP, A)  
特表平 0 6 - 5 1 1 5 1 3 (JP, A)  
特開 2 0 0 4 - 2 3 8 3 3 6 (JP, A)  
特表平 1 1 - 5 0 8 4 4 5 (JP, A)  
特表 2 0 1 6 - 5 0 2 9 8 5 (JP, A)  
米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 1 3 8 8 0 (US, A1)  
国際公開第 2 0 0 6 / 0 7 6 3 8 7 (WO, A1)  
J. Agric. Food Chem., 2 0 0 1 年, Vol.49, p.1620-1624  
Drug Development and Industrial Pharmacy, 1 9 9 8 年, Vol.24, No.9, p.863-867  
Bull. Korean Chem. Soc., 2 0 1 0 年, Vol.31, No.10, p.3035-3037  
Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2 0 0 6 年, Vol.58, p.1351-1358  
Journal of Clinical Oncology, 1 9 9 8 年 4 月, Vol.16, No.4, p.1425-1429  
The FASEB Journal, 2 0 0 4 年 1 2 月, Vol.18, No.15, p.1940-1942

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2  
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0  
A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4  
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9  
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I )  
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)